

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.09.016

青蒿多糖的制备及体内抗炎作用的研究^①

帅学宏¹, 陈吉轩¹, 施君²,
黄庆洲¹, 伍莉¹, 胡庭俊²

1. 西南大学(荣昌校区)动物医学系,重庆 荣昌 402460; 2. 广西大学 动物科学技术学院,南宁 530005

摘要:为观察青蒿多糖的体内抗炎活性,采用木瓜蛋白酶法提取青蒿多糖后对其理化性质进行了检测,以地塞米松为阳性对照,用高(100 mg/kg)、中(50 mg/kg)、低(25 mg/kg)剂量的青蒿多糖处理小白鼠,观察其对二甲苯所致炎症的抗炎效果及对小白鼠脏器指数的影响。结果表明:木瓜蛋白酶法提取的青蒿多糖不含淀粉、蛋白质及氨基酸,精制后总糖百分比为24.74%,50 mg/kg和100 mg/kg的青蒿多糖组具有较好的抗炎作用,而且100 mg/kg的青蒿多糖其抗炎效果显著优于地塞米松组($p<0.01$)。青蒿多糖对肾脏指数无影响,可升高肝脏指数和脾脏指数,对胸腺指数有一定的降低作用。表明一定剂量的青蒿多糖对小鼠具有良好的体内抗炎活性,并可影响部分脏器指数。

关键词:青蒿多糖;理化性质;抗炎作用;脏器指数

中图分类号: Q949.783.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-9868(2016)09-0102-05

青蒿 *Herba Artemisiae Annuae*, 为菊科植物,具有清透虚热,凉血除燕,解量,截疟等功效^[1]。青蒿的化学成分可分为挥发性和非挥发性成分两大类,包括异蒿酮、桉油精、青蒿素、青蒿酸等^[2]。其中,青蒿多糖是它的主要活性成分之一。研究表明青蒿多糖可显著抑制小鼠移植瘤 Eac, Heps 和 S₁₈₀ 的生长,具有明显的抗肿瘤作用。在体外,青蒿多糖能够诱导淋巴细胞转化增殖,促进淋巴细胞分泌 IFN-γ 和 IL-2,并促进巨噬细胞分泌 TNF-α^[3-4]。本试验采用木瓜蛋白酶酶解法提取青蒿多糖,并进行多糖总糖百分比测定及理化性质的分析,以二甲苯为致炎剂,在小鼠耳朵建立急性炎症模型,探讨青蒿多糖的抗炎作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

青蒿,购于广西太华药业有限公司。

木瓜蛋白酶,购于沃凯国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器

喷雾干燥仪器(常州,双环); DK-98-II水浴锅(天津,泰斯特); Hei-VAP 旋转蒸发仪(德国, heidolph);

① 收稿日期: 2014-06-27

基金项目: 国家自然科学基金(31260619); 西南大学博士基金(2010BSR03)。

作者简介: 帅学宏(1978-),男,陕西咸阳人,博士,讲师,主要从事免疫药理学研究。

通信作者: 胡庭俊,教授。

TD-5A 台式低速离心机(湖南, 凯达); Uvmini 1240 紫外分光光度计(日本, 岛津). 分析天平(瑞士, 梅特勒)等.

1.1.3 动物

昆明种清洁级健康小鼠, 雌、雄各半, 体质量为 18~22 g, 购于广西医科大学动物实验中心.

1.2 青蒿多糖的制备^[5]

将 100 g 青蒿粉碎, 按照料液比为 1:30 的比例加入蒸馏水充分混匀, 加入木瓜蛋白酶, 使酶的百分比为 1.5%, 调 pH=7.0, 在 50 °C 水浴酶解 3 h 后 70 °C 水浴 1 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液. 给滤渣中加入 3 000 mL 蒸馏水, 70 °C 水浴 1 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液. 将 2 次所得上清液合并后, 用旋转蒸发仪蒸馏浓缩至 500 mL. 待浓缩液冷却后加入 95% 乙醇使其终百分比达 80%, 充分混匀后, 4 °C 环境下静置 12 h 以上. 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀部分加入 95% 乙醇搅拌, 离心(3 000 r/min, 10 min)收集沉淀. 在沉淀中加入适量的无水乙醇搅拌均匀, 按上述方法离心收集沉淀. 干燥将得到的沉淀物放入干燥箱中 60 °C 烘干, 研成细粉, 得青蒿粗多糖. 将青蒿粗多糖按固液比为 1:20 的比例加入蒸馏水, 配成 5% 的溶液, 沸水浴 20 min, 取出冷却后, 离心(2 000 r/min, 10 min), 收集上清液. 将离心后的残渣加入等量蒸馏水, 如上操作直到沉淀完全溶解. 合并 2 次上清液, 滤纸过滤, 将所得溶液进行喷雾干燥, 收集粉末得青蒿多糖.

1.3 青蒿多糖总糖质量分数测定^[6]

葡聚糖作为对照品, 采用蒽酮—硫酸法测定青蒿多糖总糖质量分数.

1.4 青蒿多糖理化性质分析^[7]

采用 Molish 反应, 碘—碘化钾和茚三酮反应分析青蒿多糖理化性质.

1.5 青蒿多糖的红外光谱分析^[6]

取 1 mg 经干燥的青蒿多糖样品, 与 100~200 mg 经干燥的 KBr 粉末在玛瑙研钵中轻轻研磨均匀, 经压片机压成薄片后随即上机进行红外光谱扫描.

1.6 青蒿多糖的体内抗炎作用

取体质量为 18~22 g 的清洁级昆明种健康小鼠 50 只, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 雌、雄各半. 按照如下方法进行腹腔注射给药, 连续给药 5 d. I 组: 生理盐水对照组, 每只小鼠注射 0.25 mL 生理盐水; II 组: 阳性药物对照组, 地塞米松, 剂量为 25 mg/kg; III~V 组: 注射 0.25 mL 的青蒿多糖溶液, 使每组多糖的终剂量分别为 25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg. 小鼠用药前及致炎前称体质量各一次. 于最后一次给药后 1 h, 给小鼠左耳两面涂抹 0.05 mL 二甲苯致炎. 致炎后 20 min 将小鼠颈椎脱臼处死, 用直径为 6 mm 的打孔器在左右两耳的同一部位打下耳片, 立即用电子天平称量两耳片的质量.

1.7 检测和观察指标

1.7.1 炎性肿胀度和肿胀抑制率

按照 1.6 方法处理后, 计算炎性肿胀度和肿胀抑制率.

$$MESD(\text{小鼠耳肿胀度}) = \text{左耳质量} - \text{右耳质量}$$

$$ETR(\text{耳肿胀率}) = (\text{左耳质量} - \text{右耳质量}) / \text{右耳质量} \times 100\%$$

$$ETIR(\text{肿胀抑制率}) = (\text{对照组肿胀度} - \text{用药组肿胀度}) / \text{对照组肿胀度} \times 100\%$$

1.7.2 脏器指数的测定

解剖小鼠, 称肝脏、肾脏、脾脏、胸腺质量, 计算脏器指数.

$$LI(\text{肝脏指数}) = \text{肝脏质量(mg)} / \text{小鼠体质量(g)}$$

$$KI(\text{肾脏指数}) = \text{肾脏质量(mg)} / \text{小鼠体质量(g)}$$

$$SI(\text{脾脏指数}) = \text{脾脏质量(mg)} / \text{小鼠体质量(g)}$$

$$TI(\text{胸腺指数}) = \text{胸腺质量(mg)} / \text{小鼠体质量(g)}$$

1.8 数据分析

试验所得数据用平均值±标准差表示, 用 SPSS17.0 软件单因素方差分析进行数据统计.

2 结 果

2.1 青蒿多糖质量分数测定

以葡聚糖为对照品作标准曲线后, 得到回归方程为

$$y = 152.81x + 2.7574 \quad R^2 = 0.9958$$

测得精制的青蒿精多糖管吸光度为 0.0629, 经计算得多糖质量分数为 0.247 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ (图 1).

2.2 青蒿多糖理化性质分析

Molish 反应结果为青蒿多糖管的交界处有很清晰的紫褐色环. 碘—碘化钾和茚三酮反应显示青蒿多糖孔内液体无变化.

2.3 红外光谱分析

图 2 为红外光谱分析图. 由图 2 可知, 青蒿多糖在波数为 3401 cm^{-1} 附近有多糖的 O—H 伸缩振动, 在 2960 cm^{-1} 附近有多糖的 C—H 伸缩振动, 2396 cm^{-1} 附近和 $1600\sim1700\text{ cm}^{-1}$ 之间有 C=O 的伸缩振动, 1400 cm^{-1} 附近有 C—O 的伸缩振动, 在 $1000\sim1100\text{ cm}^{-1}$ 之间有 C—O 的伸缩振动. $1250\sim950\text{ cm}^{-1}$ 之间存在强吸收峰, 在 1250 cm^{-1} 附近处有吸收峰, 在 900 cm^{-1} 附近有不甚明显特征吸收峰. 在 800 cm^{-1} 处无特征吸收峰, 而 895 cm^{-1} 和 835 cm^{-1} 附近有不甚明显的吸收峰.

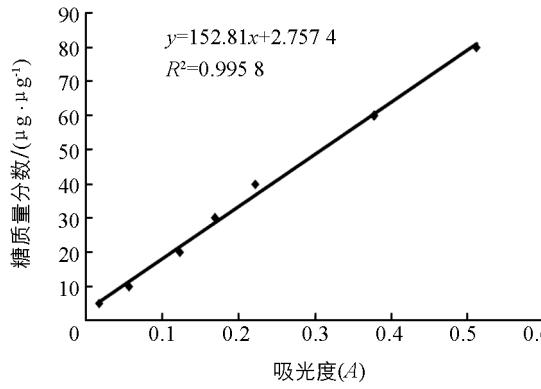


图 1 葡聚糖质量分数标准曲线

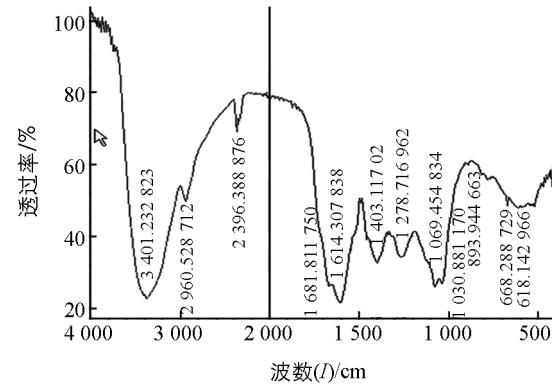


图 2 红外光谱分析图

2.4 小鼠脏器指数的变化

由表 1 可以看出, 地塞米松组和对照组相比, 肝脏指数极显著升高; 不同剂量青蒿多糖组的肝脏指数与对照组比也极显著升高($p<0.01$), 但是数值略低于地塞米松组. 各组的肾脏指数无明显差异. 地塞米松组的脾脏指数极显著低于对照组; 不同剂量青蒿多糖组的脾脏指数则极显著高于对照组和地塞米松组($p<0.01$). 地塞米松组的胸腺指数极显著低于对照组($p<0.01$); 而 $25\text{ mg}/\text{kg}$, $50\text{ mg}/\text{kg}$ 青蒿多糖组的胸腺指数与对照组无显著性差异, 与地塞米松组差异极显著; $100\text{ mg}/\text{kg}$ 青蒿多糖组的胸腺指数显著低于对照组, 却显著高于地塞米松组($p<0.05$).

表 1 青蒿多糖对致炎小鼠脏器指数的影响

$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

组别	肝脏指数	肾脏指数	脾脏指数	胸腺指数
I 空白对照组	$50.55 \pm 4.51\text{bB}$	$14.09 \pm 1.65\text{a}$	$4.02 \pm 0.95\text{bB}$	$3.03 \pm 0.6\text{aA}$
II 地塞米松组	$65.67 \pm 7.21\text{aA}$	$13.78 \pm 1.85\text{a}$	$1.43 \pm 0.58\text{cC}$	$0.85 \pm 0.549\text{dC}$
III $25\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 青蒿多糖组	$61.65 \pm 5.08\text{aA}$	$14.62 \pm 1.08\text{a}$	$6.91 \pm 1.91\text{aA}$	$2.47 \pm 0.62\text{abA}$
IV $50\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 青蒿多糖组	$60.79 \pm 3.71\text{aA}$	$14.40 \pm 1.85\text{a}$	$7.89 \pm 1.21\text{aA}$	$2.30 \pm 0.92\text{bAB}$
V $100\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 青蒿多糖组	$62.71 \pm 4.03\text{aA}$	$13.94 \pm 2.6\text{a}$	$7.57 \pm 1.11\text{aA}$	$1.59 \pm 0.55\text{cBC}$

注: 同列数据标有不同小写字母者表示差异显著($p<0.05$), 标有不同大写字母者表示差异极显著($p<0.01$), 标有相同字母表示差异不显著($p>0.05$).

2.5 青蒿多糖对小鼠耳廓肿胀的影响

表 2 结果显示 地塞米松组、 $50\text{ mg}/\text{kg}$, $100\text{ mg}/\text{kg}$ 青蒿多糖组的耳肿胀率显著低于对照组($p<0.05$), $25\text{ mg}/\text{kg}$ 青蒿多糖组与对照组相比无显著差异. 与地塞米松组相比, $25\text{ mg}/\text{kg}$ 青蒿多糖组的肿胀抑制率

无显著差异,但是50 mg/kg青蒿多糖组的耳肿胀抑制率高于地塞米松组;100 mg/kg青蒿多糖组的耳肿胀抑制率极显著高于地塞米松组($p<0.01$).

表2 青蒿多糖对致炎小鼠耳肿胀率及耳肿胀抑制率的影响

 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

组别	耳肿胀率/%	肿胀抑制率/%
I 空白对照组	94.17±39.96aA	—
II 地塞米松组	40.51±29.15bB	48.17±32.95bcB
III 25 mg·kg ⁻¹ 青蒿多糖组	88.66±32.53aA	34.18±19.71cB
IV 50 mg·kg ⁻¹ 青蒿多糖组	37.51±33.5bB	66.8±28.81aA
V 100 mg·kg ⁻¹ 青蒿多糖组	18.10±14.1bB	86.21±10.27aA

注:同列数据标有不同小写字母者表示差异显著($p<0.05$),标有不同大写字母者表示差异极显著($p<0.01$),标有相同字母表示差异不显著($p>0.05$).

3 讨论分析

蒽酮-硫酸比色法测定多糖质量分数,方法稳定,几乎可以测定所有的碳水化合物,但蒽酮试剂要新鲜配制,蒽酮溶解于硫酸一次加入即可,简化了操作步骤,减少了产生误差的因素,且该法所需仪器简单,可在常规试验条件下检测^[8-10].此法具有简单快速,灵敏度、精确度和准确性高,重现性好等优点^[11].本试验提取青蒿多糖后,使用蒽酮-硫酸比色法测出来的青蒿精多糖的总糖百分比为24.74%,与前期研究结果相似^[5].Molish反应,碘-碘化钾反应,茚三酮反应是多糖理化性质分析时常用的定性反应,本试验中通过这3种反应表明所提取的青蒿多糖中有多糖存在,无淀粉、氨基酸或蛋白质存在.

红外光谱图上每一个吸收峰都对应于分子中原子或官能团震动的情况,因此利用红外光谱可以帮助我们进行一些复杂化合物的定性及定量分析,检验分子中一些官能团和氢键的存在^[6].本试验中提取的青蒿多糖红外光谱显示:青蒿多糖在波数为3400 cm⁻¹处有羟基的伸缩振动,在2960 cm⁻¹处有糖样烷基的伸缩振动,2400 cm⁻¹和1700~1600 cm⁻¹之间有C=O的伸缩振动,1400 cm⁻¹处有C-H的伸缩振动,在1100~1000 cm⁻¹之间有C-O的伸缩振动,1250~950 cm⁻¹之间存在强吸收峰,说明糖链结构为吡喃型;在1250 cm⁻¹处有吸收峰,说明有乙酰基团存在;而895 cm⁻¹~835 cm⁻¹附近有不甚明显的吸收峰,说明多糖糖苷键构型可能是 α -型和 β -型共存;在800 cm⁻¹处无特征吸收峰,表明多糖的糖基中不存在甘露糖.

炎症是机体组织对局部损伤的反应,是具有血管系统的生物机体对损伤因子所产生的复杂防御反应,在炎症早期,炎症介质刺激血管,使血管扩张,血管内皮间隙扩大,血管壁通透性增加,血浆内的液体蛋白质和白细胞等渗出到组织间隙,随着渗出增加,造成组织肿胀^[12-13].二甲苯致小鼠耳廓肿胀试验是研究药物抗炎作用的常用试验方法之一.多糖除了有免疫增强^[14],抗氧化^[15]等作用外,还具有抗炎的生物学功能,这在先前的研究报道中屡见^[16-18].在本试验中,从耳肿胀率可看出,空白对照组使用二甲苯后使小鼠耳廓明显肿胀,而地塞米松组、50 mg/kg和100 mg/kg青蒿多糖组的耳肿胀率显著低于对照组,100 mg/kg青蒿多糖组的耳肿胀抑制率显著高于地塞米松组,表明50 mg/kg和100 mg/kg的青蒿多糖组具有较好的抗炎作用,而且100 mg/kg的青蒿多糖其抗炎效果显著优于地塞米松组.由各脏器指数可以看出,地塞米松组和青蒿多糖组对小鼠的肾脏没有伤害作用.青蒿多糖组的肝脏指数较对照组相比极显著升高,但是数值略低于地塞米松组,表明青蒿多糖组对肝脏指数有影响,但是影响程度略小于地塞米松组.100 mg/kg青蒿多糖组的胸腺指数显著低于对照组,25 mg/kg,50 mg/kg青蒿多糖组的胸腺指数与对照组无显著性差异,但高于地塞米松组并且差异极显著,表明100 mg/kg的青蒿多糖会在一定程度上引起胸腺萎缩,但是其引起胸腺萎缩的程度小于地塞米松组,25 mg/kg,50 mg/kg的青蒿多糖则对小鼠胸腺无明显影响.青蒿多糖组的脾脏指数极显著高于对照组和地塞米松组,这表明青蒿多糖会引起动物脾脏增大.

4 结论

青蒿多糖具有较好的抗炎作用.

参考文献:

- [1] 孟繁智. 新编中草药图谱大典(上卷) [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003.
- [2] 李清. 青蒿研究及应用概况 [J]. 中国医药导报, 2008, 5(36): 25, 46.
- [3] 薛明, 田丽娟. 青蒿多糖的抗肿瘤作用实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 937—938.
- [4] 薛明, 田丽娟. 青蒿多糖的免疫活性研究 [J]. 中成药, 2008, 30(8): 1211—1213.
- [5] 帅学宏, 杨燕, 黄庆洲, 等. 木瓜蛋白酶法提取青蒿多糖的工艺研究 [J]. 江苏农业科学, 2012, 4(4): 273—275.
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 2 版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [7] 帅学宏. 鬼臼多糖分离提取及免疫药理作用研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2003.
- [8] 唐丽琴, 李矗, 刘圣, 等. 葡萄糖酸比色法测定麦冬多糖的含量 [J]. 安徽医药, 2003, 7(1): 39—40.
- [9] 刘晓涵, 陈永刚, 林励, 等. 葡萄糖酸法与苯酚硫酸法测定枸杞子中多糖含量的比较 [J]. 食品科技, 2009, 34(9): 270—272.
- [10] 朱伟. 葡萄糖酸比色法测定香菇多糖含量 [J]. 北方药学, 2011, 8(8): 8—9.
- [11] 涂永勤, 朱华李, 曾纬, 等. 人工培植冬虫夏草多糖的含量测定 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2010, 32(11): 163—166.
- [12] 李玉林. 病理学 [M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [13] 吕小满, 彭芳, 杨永寿, 等. 玉簪抗炎作用的试验研究 [J]. 大理学院学报, 2010, 9(12): 15—17.
- [14] 封海波, 樊静, 刘娟, 等. 4 种多糖对口蹄疫疫苗免疫反应的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(11): 27—36.
- [15] 郭霞, 胡尚勤. 大杯伞胞外多糖的纯化及抗氧化活性 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(6): 36—40.
- [16] 赵容杰, 赵正林, 王丹, 等. 姬松茸多糖的抗炎作用 [J]. 延边大学医学学报, 2004, 27(1): 19—22.
- [17] 侯安继, 彭施萍, 项荣. 茯苓多糖抗炎作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2003, 19(3): 15—16.
- [18] 陈万生, 韩军, 李力, 等. 知母总多糖的抗炎作用 [J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(10): 758—760.

Preparation of Polysaccharides Extracted from *Herba Artemisiae Annuae* and it's Anti-Inflammatory Activity in Mice *in vivo*

SHUAI Xue-hong¹, CHEN Ji-xuan¹, SHI Jun²,
HUANG Qing-zhou¹, WU Li¹, HU Ting-jun²

1. Department of Veterinary Medicine, Southwest University (Rongchang Campus), Chongqing 402460, China;

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China

Abstract: *Herba Artemisiae Annuae* polysaccharide(HAAP) were extracted by the method of papain and its physico-chemical property were detected. The mouse was treated with HAAP(100, 50, 25 mg/kg) by intraperitoneal injection for 5 days in order to observe the anti-inflammatory effects of HAAP in different dose after successfully built the model of acute inflammation with mouse in ears made by dimethylbenzene. And dexamethasone (25 mg/kg) was used as positive control. The results showed there were no starch, protein or amine acid in HAAP, and the content of total sugar was 24.74%. HAAP at dose of 50 or 100 mg/kg had better anti-inflammatory effect. HAAP at dose of 100 mg/kg the anti-inflammatory effect was outstrip dexamethasone. HAAP had no effect on kidney index. It could increase the liver index and spleen index.

Key words: *Herba Artemisiae Annuae* polysaccharide; physico-chemical property; anti-inflammatory effect; organ index

